

EFFECTO DE PECTIC-OLIGOSACÁRIDOS DEL ALBEDO DE LA NARANJA SOBRE LA ADHESIÓN E INVASIÓN DE BACTERIAS PATÓGENAS SOBRE CÉLULAS INTESTINALES HUMANAS *IN VITRO*

Solanas, E.¹, Hotchkiss², A.T., Rastall, R.A.³

¹Laboratorio de Investigación Molecular, Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud, C/ Cardenal Gomá s/n, 50009 Zaragoza. emsolanas.iacs@aragon.es

²Eastern Regional Research Center, USDA, Wyndmore, PA 19038, USA

³Food and Bioprocessing Sciences Unit, School of Food Biosciences, University of Reading, P.O. Box 226, Whiteknights, Reading RG6 6AP, UK

INTRODUCCIÓN

En el inicio de enfermedades intestinales de origen bacteriano la adhesión y posterior invasión del epitelio intestinal por parte de los microorganismos infecciosos son pasos primordiales. Algunos oligosacáridos no digestibles (FOS, GOS, MOS) pueden inhibir la adhesión de determinadas bacterias patógenas a los receptores celulares (lectinas) de la mucosa intestinal (Ofek et al. 2003). Se ha observado que pectico-oligosacáridos (POS) obtenidos a partir de la hidrólisis ácida de los residuos resultantes durante la extracción de pectinas del albedo de la naranja, presentan actividad antiadhesiva frente a determinadas cepas de *E. coli* enteropatógenas (Rhoades et al. 2008).

El objetivo de este trabajo se centró en el estudio del efecto de distintas fracciones de pectico-oligosacáridos sobre la adhesión e invasión de distintos patógenos bacterianos intestinales a la mucosa intestinal humana, mediante el uso de cultivos celulares "in vitro".

MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron dos diferentes fracciones de POS obtenidas en el USDA Eastern Regional Research Center (Wyndmore, USA) mediante hidrólisis ácida de residuos de la extracción de pectina del albedo de la naranja (Manderson *et al.*, 2005). Una de las muestras se obtuvo del filtrado tras la extracción de la pectina (POS2) y la otra del material flotando sobre el filtrado (POS1).

Se estudiaron un total de tres cepas de bacterias enteropatógenas: *E. coli* 0157:H7 (*E. coli* enterohemorrágica, EHEC), *E. coli* 0125:H6 (*E. coli* enteropatógena, EPEC) y *S. typhimurium* (ST).

Estudios de adhesión-invasión en cultivos celulares: Los estudios toxicidad y de adhesión-invasión se realizaron sobre la línea celular intestinal humana Caco-2. Las células se sembraron en placa de cultivo celular de 24 pocillos, a una densidad de 1×10^4 cél./ml y pocillo respectivamente, y se mantuvieron en medio mínimo esencial de Eagle (EMEM) con un 10% de suero fetal bovino, 1% de antibióticos y un 1% de aminoácidos no esenciales, a 37°C y bajo un 5% de CO₂. Dichos estudios se efectuaron tras 7 o 21 días de cultivo de las células dependiendo de la parte del intestino colonizada por la bacteria a estudio (Pinto *et al.*, 1983), intestino delgado (21 d., células enterocíticas) para EPEC y ST, o intestino grueso (7 d., células indiferenciadas, no secretoras de enzimas digestivas) para EHEC.

A fin de comprobar la citotoxicidad de la muestra y determinar la mayor concentración de POS inocua para las células, tras incubar las células durante 3 horas con 1 ml/pocillo de POS disuelto en DPBS, a 5 dosis distintas (0.5, 1.0, 2.5, 5.0 y 10 mg/ml), se determinó la viabilidad celular, frente a células incubadas en DPBS, por el método Azul – Trypan. Cada dosis fue evaluada en 2 pocillos/placa, en tres pases celulares consecutivos.

La adhesión – invasión de las bacterias a las células en presencia de POS se determinó por el método descrito por Elsinghorst (1994). Se infectaron las monocapas celulares con 1 ml/pocillo de suspensiones de cada una de las bacterias a estudio (1×10^8 UFC/ml) en 2.5 mg/ml de POS en DPBS y se incubaron bajo condiciones estándar durante 2 horas para ST y 3 horas para EHEC y EPEC. A estos tiempos, en la mitad de los pocillos se determinó la adhesión-invasión tras doble lavado con PBS, lisis de células eucariotas con una solución 1% de Triton X-100, siembra de diluciones seriadas del contenido de cada pocillo en placas de agar Mueller-Hinton y conteo de las UFC. La invasión se determinó en la otra mitad de pocillos, tras una incubación adicional durante una hora en medio de cultivo con gentamicina (100 mg/ml) para destruir las bacterias extracelulares, siguiendo posteriormente el protocolo

anterior. Para cada bacteria a estudio, adhesión e invasión se determinaron por triplicado (3 pocillos/placa), en 3 pases consecutivos de células. En cada placa se incubaron 3 pocillos de células y 1ml de la suspensión bacteriana únicamente en DPBS, como control tanto para la adhesión como para la invasión.

Para determinar si las muestras de POS podían ser fermentadas por las bacterias a estudio, se estudió el crecimiento de éstas (Δ UFC) al ser incubadas (1×10^8 UFC/ml) con soluciones de POS a 2.5mg/ml en DPBS durante 3 horas a 37°C y un 5% de CO₂, frente a cuando eran incubadas únicamente con DPBS. La carga eléctrica neta de las bacterias en suspensión en soluciones de DPBS, POS1 y POS2 (2.5 mg/ml de DPBS) se midió por el potencial zeta. Los datos de adhesión e invasión fueron analizados por análisis de varianza, considerando el pase celular como efecto bloque y el tratamiento con POS como efecto principal, mediante el programa estadístico SAS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

POS 1 y 2 a una dosis de 10 mg/ml provocó una muerte celular del 100%, tanto en las células indiferenciadas como diferenciadas. En las células indiferenciadas, POS a una concentración de 5mg/ml dio una menor viabilidad celular que las células control, incubadas únicamente con DPBS (73.4 con POS1, 75.7 con POS2 vs 85.6.2% con DPBS, $P < 0.10$). El resto de las concentraciones de POS1 y POS2 a estudio no afectaron negativamente la viabilidad de las células indiferenciadas ($P > 0.05$). La viabilidad de las células diferenciadas se vio afectada de la misma manera que en el caso anterior. En función de estos datos, la dosis elegida para los estudios de adhesión-invasión fue aquella más alta sin efectos citotóxicos a nivel celular (2.5 mg/ml).

No se observaron incrementos significativos ($P > 0.05$) en las poblaciones de EHEC, EPEC y ST al ser incubadas bajo las mismas condiciones que en las pruebas de adhesión-invasión con soluciones de POS1 y POS2 en DPBS (2.5 mg/ml). Esto nos permite afirmar que las muestras de POS no afectan el crecimiento bacteriano bajo las condiciones a estudio y no existe una fermentación de las muestras por parte de las bacterias que conlleve un aumento en la población bacteriana que pueda enmascarar el efecto anti-adhesivo.

El efecto de los POS sobre la adhesión e invasión de las bacterias a estudio dependió de la cepa bacteriana. La incubación con POS provocó una ligera mayor adhesión de EHEC a células Caco-2, resultando únicamente significativa con POS2. Sin embargo, la invasión de EHEC a células Caco-2 disminuyó significativamente ($P < 0.001$), cuando fue incubada en presencia tanto de POS1 como de POS2, sin aparecer diferencias significativas ($P > 0.05$) entre ambas muestras (Tabla 1).

Similares efectos, aunque más patentes, se observaron para EPEC, puesto la adhesión resultó significativamente ($P < 0.05$) mayor con ambos POS, mientras que la invasión celular fue 10 veces menor ($P < 0.001$). Lo mismo ocurrió para ST, aunque debido a la alta variabilidad experimental no se observaron diferencias significativas en la adhesión.

Estos resultados no coinciden con los encontrados con Rhoades *et al.* (2008), que estudiando POS en células HT29 frente a diferentes cepas de EPEC, observaron un descenso en la adhesión celular.

La carga neta superficial de cada cepa bacteriana suspendida a una concentración de 1×10^8 UFC/ml en soluciones de 2.5 mg/ml de POS1 (-19.4 ± 1.54 mV de media) y POS2 (-20.7 ± 2.01 mV de media) en DPBS fue significativamente menor ($P < 0.05$) que cuando se suspendieron únicamente en DPBS (-7.2 ± 0.99 mV). La diferente carga a nivel de la superficie bacteriana en presencia de POS pudo provocar una mayor atracción hacia la superficie celular sin implicar una adhesión real de las bacterias a la membrana celular (Weerkamp *et al.* 1988), pudiendo bloquear la colonización celular por unión a las fimbrias de adhesión (Rhoades *et al.* 2008). Esto explicaría una mayor adhesión y al mismo tiempo una menor invasión bacteriana.

Conclusión: las muestras de pectico-oligosacáridos estudiadas, obtenidas de los residuos de la extracción de pectina del albedo de la naranja inhiben la invasión de las bacterias a estudio, *E. coli* 0157:H7, *E. coli* 0125:H6 y *S. typhimurium* en células Caco-2, que representan *in vitro* el epitelio intestinal.

Tabla 1. Adhesión e invasión de EHEC, EPEC y ST sobre células Caco-2 en presencia de POS

	DPBS	POS1	POS2	DE (n=9)	Signif. Tto
<i>E. coli</i> O157:H7:					
Adhesión	1.0 x 10 ⁶ A	2.4 x 10 ⁶ AB	3.8 x 10 ⁶ B	1.4 x 10 ⁶	**
Invasión	4.7 x 10 ⁴ A	1.3 x 10 ⁴ B	1.6 x 10 ⁴ B	1.3 x 10 ⁴	***
<i>E. coli</i> O125:H6:					
Adhesión	8.1x 10 ⁵ B	4.7 x 10 ⁶ A	5.3 x 10 ⁶ A	3.1 x 10 ⁶	*
Invasión	5.8 x 10 ⁴ A	6.9 x 10 ³ B	4.4x 10 ³ B	2.4 x 10 ⁴	***
<i>S. typhimurium:</i>					
Adhesión	5.7 x 10 ⁵	4.1 x 10 ⁶	1.5 x 10 ⁷	1.4 x 10 ⁷	ns
Invasión	8.04 x 10 ³ A	1.86 x 10 ³ B	0.64 x 10 ³ B	1.7 x 10 ³	***

ns($P>0.05$); *($P<0.05$); ** ($P<0.01$); ***($P<0.001$); Letras diferentes dentro de la misma fila muestran diferencias significativas entre tratamientos ($P<0.05$)

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

•Elsinghorst EA. 1994. *Methods Enzymol* 236: 405-420 • Manderson K, Pinart M, Tuohy KM, Grace WE, Hotchkiss AT, Widmer W, Yadhav MP, Gibson GR, Rastall RA. 2005. *Appl Environ Microbiol* 71: 8383-89. • Ofek, I, Hasty DL, Sharon N. 2003. *FEMS Immunol Med Microbiol* 38:181-191. • Pinto, M., Robine-Leon, S., Appay, M.D., Kedinger, M., Triadou, N., Dussaulx, E., Lacroix, B., Simon-Assman, P., Haffen, K., Fogh, J. and Zweibaum, A., 1983. *Biol Cell* 47: 323-330. •Rhoades J, Manderson K, Wells A, Hotchkiss AT Jr, Gibson GR, Formentin K, Beer M, Rastall RA., 2008. *J Food Prot.* 71:2272-2277 • Weerkamp AH, Uyen HM, Busscher HJ. 1988. *J Dent Res.* 67:1483-1487.

EFFECT OF PECTIC-OLIGOSACCHARIDES FROM ORANGE ALBEDO ON ENTEROPATHOGEN BACTERIA ADHESION-INVASION OF HUMAN GUT EPITHELIAL CELLS *IN VITRO*

ABSTRACT: The aim of the study was to investigate the ability of pectic oligosaccharides (POS) to inhibit adhesion and invasion of three relevant enteropathogen bacteria strains: the enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7, the enteropathogenic *E. coli* O125:H6 and *S. typhimurium* to human intestinal epithelial cell cultures using the human Caco-2 cell line. Two different POS fractions resulting in pectin extraction from orange albedo, were tested, POS1 (from filtrate) and POS 2 (from floc). Bacteria tested showed a higher adhesion with POS1 and POS2 at a dose of 2.5 mg/ml ($P<0.05$ for *E. coli* strains, $P>0.05$ for *S. typhimurium*), nevertheless invasion was significantly reduced ($P<0.001$) for the three bacteria strains, especially for *E. coli* 125:H6 when they were incubated with either POS1 or POS2 in DPBS on Caco-2 monolayers. Reduction of zeta potential of bacteria strains on POS solutions could produce an apparent or unspecific attachment of bacteria to cells which did not imply a real bacteria attachment to cells and consequent cell invasion.

Keywords: oligosaccharides, *E. coli*, *Salmonella*, cell adhesion